



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان
دانشکده داروسازی و علوم دارویی

مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی سمیت سلولی تعدادی از مشتقات کومارینی سنتز شده بر روی
رده سلولی MCF-7 و 3T3

توسط:

آزاده ابراهیمی

اساتید راهنما:

دکتر صالحه صبور

دکتر مهدی عباسزاده



**Kerman University of Medical Sciences
Faculty of Pharmacy**

Pharmaceutics Research Center

Pharm. D Thesis

Title:

**Evaluation of cytotoxicity of some synthetic coumarin derivatives on
MCF-7 and 3T3 cell lines**

By:

Azade Ebrahimi

Supervisors:

Dr. Salehe Sabouri

Dr. Mehdi Abaszadeh

اظهارنامه و حق انتشار

اینجانب آزاده ابراهیمی متعهد می‌شوم موارد مذکور در این پایان‌نامه حاصل فعالیت‌های پژوهشی خود بوده و مسئولیت صحت داده‌ها و اطلاعات گزارش شده در این پایان‌نامه را به عهده می‌گیرم. تمامی حقوق مادی و معنوی این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان بوده و هر گونه استفاده تنها با کسب اجازه ممکن خواهد بود. استناد به مطالب و نتایج این پایان‌نامه در صورتی که به نحو مناسبی ارجاع داده شود، بلامانع است.

امضاء دانشجو
تاریخ ۹۹، ۴، ۳۰

PharmD Thesis کرمان داروسازی

خلاصه فارسی

مقدمه: رشد و تکثیر غیرقابل کنترل سلول‌های بدن که به دلایل مختلف اتفاق می‌افتد را سرطان می‌گویند. سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در بین زنان محسوب می‌شود. کومارین‌ها دسته مهمی از ترکیبات دارویی هستند که نقش ویژه‌ای در طبیعت دارند. اثربخشی آن‌ها در موارد مختلفی مشخص شده و با توجه به تأثیرات بالقوه سودمند آن‌ها بر سلامت انسان، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند. کومارین‌ها به عنوان ترکیبات امیدبخش با اثرات متعدد مانند ضدتکثیری، القاء کننده آپوپتوز و ضدگرزایی در درمان سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند؛ بنابراین در این تحقیق اثر سمیت سلولی مشتقات با هسته 3-هیدروکسی‌کومارین مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: رده‌های سلولی 3T3 و MCF-7 در محیط کشت کامل DMEM با 10٪ سرم جنین گاوی و 1٪ آنتی‌بیوتیک در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و فشار 5٪ کربن دی‌اکسید انکوبه شدند. پس از تکثیر، 1×10^4 سلول در هر یک از خانه‌های میکروپلیت‌های 96 خانه قرار داده شدند. بعد از 24 ساعت، ترکیبات سنتز شده با حداقل مقدار دی‌متیل سولفوکسید حل شده و با محیط کشت رقیق و به سلول‌ها اضافه شدند. سلول‌های تیمار شده به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. فعالیت متابولیکی سلول‌ها با استفاده از MTT مورد بررسی قرار گرفت و مقادیر IC_{50} ترکیبات محاسبه شد. میزان زنده‌مانی سلول‌ها نیز با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، به بررسی اثر ترکیبات بر آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری پرداخته شد. سلول‌های MCF-7 در فلاسک 25 cm^2 کشت داده شدند. پس از افزودن ترکیبات به سلول‌ها و انکوباسیون 24 ساعته، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و با annexin V-FITC و پروپیدیوم یدید رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی شدند.

نتایج: مشتقات با هسته 3-هیدروکسی کومارین که دارای استخلاف در موقعیت پارا روی حلقه آروماتیک استخلاف شده خود بودند، در غلظت‌های به کار برده رشد سلول‌های MCF-7 را مهار کردند. کمترین IC₅₀ بر روی رده سلولی MCF-7 مربوط به ترکیب 3-آمینو-1-(4،2-دی‌کلروفنیل)-5-اکسو-1-دی‌هیدروپیرانو[c-3،2]کرومن-2-کربونیتریل با مقدار $15/25 \pm 1/05$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این ترکیب روی رده‌ی سلولی 3T3 با مقدار $IC_{50} = 17/2 \pm 28/09 \mu g/ml$ نیز اثر داشت. در آزمایش تریپان بلو، ترکیبات 3-آمینو-1-(4،2-دی‌کلروفنیل)-5-اکسو-1-دی-هیدروپیرانو[c-3،2]کرومن-2-کربونیتریل و 3-آمینو-1-(4-بروموفنیل)-5-اکسو-1-فنیل-5-دی‌هیدروپیرانو[c-3،2]کرومن-2-کربونیتریل دارای کمترین درصد سلول زنده به ترتیب در غلظت‌های 50 و 100 میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. در فلوسایتومتری مشخص شد که بیشترین آپوپتوز مربوط به ترکیب 3-آمینو-1-(4-بروموفنیل)-5-اکسو-1-فنیل-5-دی‌هیدروپیرانو[c-3،2]کرومن-2-کربونیتریل با میزان 93/98 درصد است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، به نظر می‌رسد که استخلاف در موقعیت پارا روی حلقه موجود در ساختار، ترکیب را به حالت سمی‌تر تغییر می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که مشتقات با هسته 3-هیدروکسی کومارین دارای اثرات بالقوه ضدسرطان هستند. بین ساختار و فعالیت ضدتکثیری ترکیبات رابطه وجود دارد. آنالوگ‌های استخلاف شده با هالوژن، دارای سمیت سلولی مناسبی بر روی رده سلولی MCF-7 با مکانیسم احتمالی القای آپوپتوز هستند و تحقیقات بیشتر در این زمینه با ارزش است.

کلمات کلیدی: 3-هیدروکسی کومارین، فلوسایتومتری، MCF-7، آپوپتوز، سمیت سلولی

Abstract

Introduction: The uncontrolled growth and proliferation of body cells that occur due to a variety of reasons is called cancer. Breast cancer is one of the most common and deadly malignancies among women. Coumarins are an important class of compounds that have a special role in nature. Their efficacy has been identified in different cases, and they have received special attention due to their potential beneficial effects on human health. Coumarins have been considered as promising compounds with numerous effects such as antiproliferative, apoptosis inducer, and antiangiogenesis in treatment of cancers. Therefore, in this investigation, the cytotoxic effect of some derivatives containing 3-hydroxycoumarin nucleus was evaluated.

Methods: The MCF-7 and 3T3 cells were incubated in DMEM growth medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics at 37°C and 5% of CO₂. After proliferation, 1×10^4 cells were placed into each well of a 96-well culture microplate. After 24 hours of incubation, different concentrations of the synthesized compounds dissolved in minimum amount of dimethyl sulfoxide and diluted with growth medium were added to the cells. After 24 hours of incubation, the cytotoxicity of the compounds was evaluated by MTT assay and IC₅₀ values were calculated. The cell viability was also evaluated by trypan blue dye exclusion method. The effect of compounds on apoptosis was further investigated using flow cytometry. The MCF-7 cells were cultured in 25 cm² flasks. After adding the compounds to the cells and 24-hour incubation, the cells were removed, stained with annexin V-FITC and propidium iodide, and examined by a flow cytometer.

Results: Derivatives with 3-hydroxycoumarin nucleus bearing a moiety on their para position of the aromatic ring inhibited the growth of MCF-7 cells. The minimum IC₅₀ on MCF-7 cell line was related to the compound 3-amino-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-oxo-1,5-dihydropyrano[2,3-c]chromene-2-carbonitrile with an IC₅₀ value of 15.25 ± 1.05 µg/ml. This compound also had an effect on the 3T3 cell line with an IC₅₀ = 17.28 ± 2.09 µg/ml. Trypan blue test, compounds 3-amino-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-oxo-1,5-dihydropyrano[2,3-c]chromene-2-carbonitrile and 3-amino-1-(4-bromophenyl)-5-oxo-1,5-dihydropyrano[2,3-c]chromene-2-carbonitrile had the lowest viability at concentrations of 50 and 100 µg/ml, respectively. The flow cytometry assay revealed that the highest apoptosis was for compound 3-amino-1-(4-bromophenyl)-5-oxo-1,5-

dihydropyrano[2,3-c]chromene-2-carbonitrile (93.98%). Based on the results, it seems that a moiety on para position of the aromatic ring in the structure change the compound to a more toxic one.

Conclusion: The results showed that derivatives with 3-hydroxycoumarin nucleus have the potential anticancer effects. There is a relationship between the structure and the antiproliferative activity of the compounds. Halogen-substituted analogues have good cytotoxicity on MCF-7 cell line with propable apoptotic induction mechanism, so further research in this field is valuable.

Keywords: 3-Hydroxycoumarin Derivatives, Flow Cytometry, MCF-7, Apoptosis, Cytotoxicity.

PharmD Thesis کرمان داروسازی دانشگاه

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

I.....	خلاصه فارسی
V.....	Abstract
VII	فهرست مطالب
IX	فهرست جدول‌ها
X.....	فهرست شکل‌ها
33	فهرست نمودارها

[فصل اول: مقدمه](#)

Error! Bookmark not defined.	1-1- پیشگفتار و هدف
Error! Bookmark not defined.	1-2- سرطان
Error! Bookmark not defined.	1-2-1- فاکتورهای خطر در بیماری سرطان
Error! Bookmark not defined.	1-3- سرطان پستان
Error! Bookmark not defined.	1-3-1- مهم‌ترین عوامل دخیل در ایجاد سرطان پستان
Error! Bookmark not defined.	1-3-1-1- جنس
Error! Bookmark not defined.	1-3-1-2- سن
Error! Bookmark not defined.	1-3-1-3- عوامل فردی
Error! Bookmark not defined.	1-3-1-4- نداشتن زایمان
Error! Bookmark not defined.	1-3-1-5- یائسگی بعد از 55 سالگی
Error! Bookmark not defined.	1-3-2- روش‌های درمان سرطان پستان

Error! Bookmark not defined.	<u>1-3-2-1- شیمی درمانی</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-3-2-2- هورمون درمانی</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-3-2-3- روش های درمان بیولوژیکی</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-4- چشم انداز آینده</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-5- کو مارین ها</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-6- خصوصیات رده سلولی MCF-7 و 3T3</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-6-1- رده سلولی MCF-7</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-7- روش های بررسی سمیت سلولی</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-7-1- آزمون MTT</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-7-2- آزمون BST</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-7-3- آزمون لاکتات دهیدروژناز یا LDH</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-8- بررسی روش های آپوپتوز</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>1-8-1- تکنیک فلو سایتومتری</u>

فصل دوم: مواد، دستگاه ها و روش ها

Error! Bookmark not defined.	<u>2-1- مواد و وسایل مورد استفاده</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>2-2- دستگاه های مورد استفاده</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>2-3- تهیه محلول</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>PBS -2-3-1</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>2-3-2- تریپسین استریل 0/25 درصد</u>
Error! Bookmark not defined.	<u>2-3-3- آنتی بیوتیک ها</u>

Error! Bookmark not defined.	2-3-4- محیط کشت سلولی
Error! Bookmark not defined.	2-3-5- محلول دوکسوروبیسین
Error! Bookmark not defined.	2-4- ساختار ترکیبات مورد بررسی
Error! Bookmark not defined.	2-5- نحوه نگهداری و کشت سلول‌ها
Error! Bookmark not defined.	2-5-1- دریافت سلول‌ها
Error! Bookmark not defined.	2-5-2- از انجماد خارج کردن سلول‌ها
Error! Bookmark not defined.	2-5-3- پاساژ سلول‌ها
Error! Bookmark not defined.	2-5-4- انجماد سلول‌ها
Error! Bookmark not defined.	2-5-5- شمارش و تعیین درصد سلول‌های زنده
Error! Bookmark not defined.	2-6- انجام آزمایش سمیت سلولی
Error!	2-6-1- اضافه کردن سلول و ترکیبات سنتز شده به چاهک‌های میکروپلیت
	Bookmark not defined.
Error! Bookmark not defined.	2-6-2- آزمایش MTT
Error! Bookmark not defined.	2-6-3- آزمایش تریپان بلو
Error! Bookmark not defined.	2-7- ارزیابی آپتوز به وسیله‌ی فلوسایتومتر
Error! Bookmark not defined.	2-8- آزمون آماری

فصل سوم: نتایج

Error! Bookmark not defined.	3-1- سمیت سلولی به روش MTT
Error!	3-2- بررسی اثر ترکیبات بر زیست‌پذیری سلول‌ها به روش خروج رنگ تریپان بلو
	Bookmark not defined.

Error! Bookmark not defined. 3-3- ارزیابی میزان آپیتوز

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

Error! Bookmark not defined. 4-1- بحث و نتیجه‌گیری

Error! Bookmark not defined. 4-2- پیشنهادات

منابع

36 منابع

PharmD Thesis کرمان داروسازی

فهرست جدول‌ها

صفحه

عنوان

جدول 1-2- مواد و وسایل مورد استفاده..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول 2-2- دستگاه‌های مورد استفاده..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول 2-3- اجزای PBS..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول 1-3- مقادیر محاسبه شده IC_{50} برای مشتقات کومارینی سنتز شده ($\mu g/ml$) **ERROR!**

BOOKMARK NOT DEFINED.

جدول 2-3- درصد سلول‌های MCF-7 زنده، نکروز، آپوپتوز و آپوپتوز تأخیری تحت تأثیر مشتقات

کومارینی توسط دستگاه فلوسایتومتری..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

فهرست شکل‌ها

صفحه

عنوان

شکل 1-1- چند نوع کومارین **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

شکل 2-1- ترکیب کومارینی با اثر قوی در مهار سلول‌های سرطانی نازوفارنکس **ERROR!**

BOOKMARK NOT DEFINED.

شکل 3-1- نمای میکروسکوپی سلول‌های MCF-7 **ERROR! BOOKMARK NOT**

DEFINED.

شکل 4-1- نمای میکروسکوپی سلول‌های 3T3 **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

شکل 5-1- احیای MTT توسط آنزیم میتوکندریایی به کریستال‌های فورمازان **ERROR!**

BOOKMARK NOT DEFINED.

شکل 6-1- واکنش تبدیل پیروات به لاکتات توسط آنزیم لاکتات دهیدروژناز **ERROR!**

BOOKMARK NOT DEFINED.

شکل 1-2- ساختار شیمیایی ترکیبات مورد بررسی **ERROR! BOOKMARK NOT**

DEFINED.

شکل 2-2- نمایی از تقسیم‌بندی‌های نئوبار در زیر میکروسکوپ **ERROR! BOOKMARK**

NOT DEFINED.

شکل 1-3- میزان آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با مشتقات کومارینی با استفاده از

فلوسایتومتری با رنگ‌آمیزی انکسین-V و PI **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

فهرست نمودارها

صفحه

عنوان

ERROR! نمودار 3-1- اثر سمیت ترکیب C بر رده سلولی MCF-7 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-2- اثر سمیت ترکیب E بر رده سلولی MCF-7 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-3- اثر سمیت ترکیب G بر رده سلولی MCF-7 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-4- اثر سمیت ترکیب H بر رده سلولی MCF-7 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-5- اثر سمیت ترکیب J بر رده سلولی MCF-7 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-6- اثر سمیت ترکیب L بر رده سلولی MCF-7 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-7- اثر سمیت ترکیب N بر رده سلولی MCF-7 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-8- اثر سمیت ترکیب O بر رده سلولی MCF-7 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-9- اثر سمیت ترکیب C بر رده سلولی 3T3 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-10- اثر سمیت ترکیب E بر رده سلولی 3T3 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-11- اثر سمیت ترکیب G بر رده سلولی 3T3 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-12- اثر سمیت ترکیب H بر رده سلولی 3T3 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-13- اثر سمیت ترکیب J بر رده سلولی 3T3 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-14- اثر سمیت ترکیب L بر رده سلولی 3T3 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-15- اثر سمیت ترکیب N بر رده سلولی 3T3 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

ERROR! نمودار 3-16- اثر سمیت ترکیب O بر رده سلولی 3T3 در بررسی توسط MTT

BOOKMARK NOT DEFINED.

نمودار 3-17- مقایسه اثرات سمیت سلولی ترکیبات مختلف بر روی رده سلولی MCF-7 با روش

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.....MTT

نمودار 3-18- مقایسه اثرات سمیت سلولی ترکیبات مختلف بر روی رده سلولی 3T3 با روش

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.....MTT

نمودار 3-19- درصد بقای سلول‌های تیمار شده با ترکیبات کومارینی پس از رنگ‌آمیزی با

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED..... تریپان بلو

PharmD Thesis گرامان داروسازی دانشگاه

منابع

منابع

- [1] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D.M, Piñeros M, *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: Globocan sources and methods. **Int J Cancer** 2019; 144:1941-53.
- [2] Semini, G, Hildmann A, Haefen C, Danker K. Glycosidated phospholipids-a promising group of anti-tumour lipids. **Anti-Cancer Agent Me** 2014; 14:607-17.
- [3] Li W, Sun YN, Yan XT, Yang SY, Kim EJ, Kang HK, *et al.* Coumarins and lignans from *Zanthoxylum schinifolium* and their anticancer activities. **J Agric Food Chem** 2013; 61:10730-40.
- [4] Sakunpak A, Matsunami K, Otsuka H, Panichayupakaranant P. Isolation of new monoterpene coumarins from *Micromelum minutum* leaves and their cytotoxic activity against *Leishmania major* and cancer cells. **Food Chem** 2013; 139:458-63.
- [5] Klich K, Pyta K, Kubicka M, Ruszkowski P, Celewicz L, Gajecka M, *et al.* Synthesis, antibacterial, and anticancer evaluation of novel spiramycin-like conjugates containing C(5) triazole arm. **J Med Chem** 2016; 59:7963-73.
- [6] Jamier V, Marut W, Valente S, Chéreau C, Chouzenoux S, Nicco C, *et al.* Chalcone-coumarin derivatives as potential anti-cancer drugs: an *in vitro* and *in vivo* investigation. **Anti-Cancer Agent Me** 2014; 14:963-74.
- [7] Bimonte S, Barbieri A, Palma G, Luciano A, Rea D, Arra C. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. **Biomed Res Int** 2013;2013.
- [8] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. **CA: Cancer J Clin** 2016; 66:7-30.
- [9] Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J Natl Cancer Inst** 1981; 66:1192-308.
- [10] Kolahdoozan SH, Sadjadi A, Radmard AR, Khademi H. Five common cancers in Iran. **Arch Iran Med** 2010; 13: 143-6.
- [11] Touisni N, Maresca A, McDonald PC, Lou Y, Scozzafava A, Dedhar S, *et al.* Glycosyl coumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. **J Med Chem** 2011; 54:8271-77.

- [12] Nicolini A, Ferrari P, Masoni MC, Fini M, Pagani S, Giampietro O, *et al.* Malnutrition, anorexia and cachexia in cancer patients: a mini-review on pathogenesis and treatment. **Biomed Pharmacother** 2013; 67:807-17.
- [13] Schoultz EV, Rutqvist LE. Menopausal hormone therapy after breast cancer: the Stockholm randomized trial. **J Natl Cancer Ins** 2005; 97: 533-5.
- [14] Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2005; 353:1659-72.
- [15] Deng XH, Song HY, Zhou YF, Yuan GY, Zheng FJ. Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin *in vitro*. **Exp Ther Med** 2013; 6:1155-58.
- [16] Kaminsky D, Kryshchyshyn A, Nektegayev I, Vasylenko O, Grellier P, Lesyk R. Isothiocoumarin-3-carboxylic acid derivatives: synthesis, anticancer and antitrypanosomal activity evaluation. **Eur J Med Chem** 2014; 75:57-66.
- [17] Pingaew R, Saekee A, Mandi P, Nantasenamat C, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel chalcone-coumarin hybrids as anticancer and antimalarial agents. **Eur J Med Chem** 2014; 85:65-76.
- [18] Nasr T, Bondock S, Youns M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. **Eur J Med Chem** 2014; 76:539-48.
- [19] Celikeyzen FC, Orek C, Parlak AE, Sarac K, Turkez H, Tozlu Ö. Synthesis, structure, cytotoxic and antioxidant properties of 6-ethoxy-4-methylcoumarin. **J Mol Struct** 2020; 1205.
- [20] Bailly F, Maurin C, Teissier E, Vezin H, Cotellet P. Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives. **Bioorg Med Chem** 2004; 12:5611-18.
- [21] Gacche RN, Jadhav SG. Antioxidant activities and cytotoxicity of selected coumarin derivatives: preliminary results of a structure-activity relationship study using computational tools. **Int J Clin Exp Med** 2012;4:165-69.
- [22] Sashidhara KV, Kumar A, Kumar M, Sarkar J, Sinha S. Synthesis and *in vitro* evaluation of novel coumarin-chalcone hybrids as potential anticancer agents. **Bioorg Med Chem Lett** 2010;20:7205-11.
- [23] Kaur M, Kohli S, Sandhu S, Bansal Y, Bansal G. Coumarin: a promising scaffold for anticancer agents. **Anti-Cancer Agents Med Chem** 2015; 15:1032-48.

- [24] Vijay Avin BR, Thirusangu P, Ranganatha VL, Firdouse A, Prabhakar BT, AraKhanum S. Synthesis and tumor inhibitory activity of novel coumarin analogs targeting angiogenesis and apoptosis. **Eur J Med Chem** 2014; 75:211-21.
- [25] Thakur A, Singla R, Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. **Eur J Med Chem** 2015; 101:476-95.
- [26] Dandriyal J, Singla R, Kumar M, Jaitak V. Recent developments of C-4 substituted coumarin derivatives as anticancer agents. **Eur J Med Chem** 2016; 119:141-68.
- [27] Emami S, Dadashpour S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. **Eur J Med Chem** 2015; 102:611-30.
- [28] Kurt BZ, Kandas NO, Dag A, Sonmez F, Kucukislamoglu M. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-chalcone derivatives containing urea moiety as potential anticancer agents. **Arab J Chem** 2020; 13:1120-29.
- [29] Musa MA, Latinwo LM, Joseph MY, Badisa VL. Identification of 7, 8-diacetoxy-3-aryl coumarin derivative as a selective cytotoxic and apoptosis-inducing agent in a human prostate cancer cell line. **Anticancer Res** 2017; 37:6005-14.
- [30] Sandhu S, Bansal Y, Silakari O, Bansal G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. **Bioorg Med Chem** 2014; 22:3806-14.
- [31] Lv N, Sun M, Liu C, Li J. Design and synthesis of 2-phenylpyrimidine coumarin derivatives as anticancer agents. **Bioorg Med Chem Lett** 2017; 27:4578-81.
- [32] Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. **J Natl Cancer Inst** 2015; 107: 1-5.
- [33] Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1973; 51:1409-16.
- [34] Mansara PP, Deshpande RA, Vaidya MM, Kaul-Ghanekar R. Differential ratios of omega fatty acids (AA/EPA+DHA) modulate growth, lipid peroxidation and expression of tumor regulatory MARBPs in breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231. **PLoS One** 2015; 10: e0136542.
- [35] Todaro G.J, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **J Cell Biol** 1963; 17:299-313.
- [36] Ian freshney R, **Culture of animal cells**. 3rd ed. NewYork: John Wiley & Sons 1994: 226-232.

- [37] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods** 1986; 89:271-77.
- [38] Weichert H, Blechschmidt I, Schröder S, Ambrosius H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). **Allerg Immunol** 1991; 37:139-44.
- [39] Lieberman M. A brine shrimp bioassay for measuring toxicity and remediation of chemicals. **J Chem Educ** 1999; 76:1689-91.
- [40] Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **J Immunol Methods** 1988; 115:61-9.
- [41] Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. **Cytotechnology** 2012; 64:109-30.
- [42] Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. **Semin Hematol** 2001; 38:179-93.
- [43] LaPensee EW, Schwemberger SJ, LaPensee CR, Bahassi EM, Afton SE, Ben-Jonathan N. Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase. **Carcinogenesis** 2009; 30:1298-304.
- [44] Jones G E. **Human cell culture protocols**. London, UK: Humana Press, 1996: 101-9.
- [45] Rejhova A, Opattova A, Čumová A, Slíva D, Vodička P. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. **Eur J Med Chem** 2018; 144: 582-94.
- [46] Klenkar J, Molnar M. Natural and synthetic coumarins as potential anticancer agents. **J Chem Pharm Res** 2015; 7:1223-38.
- [47] Riveiro ME, Moglioni A, Vazquez R, Gomez N, Facorro G, Pieh L, *et al.* Structural insights into hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells. **Bioorg Med Chem Lett** 2008; 16:2665-75.
- [48] Dong Y, Shi Q, Liu YN, Wang X, Bastow KF, Lee KH. Antitumor agents: design, synthesis, and biological evaluation of novel 2-(furan-2-yl) naphthalen-1-ol derivatives as potent and selective antibreast cancer agents. **J Med Chem** 2009; 52:3586-90.

- [49] Wang G, Lu M, Yao Y, Wang J, Li J. Esculetin exerts antitumor effect on human gastric cancer cells through IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway. **Eur J Pharmacol** 2017; 814:207-15.
- [50] Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp Cell Res** 2003; 283:1–16
- [51] Ballazhi L, Popovski E, Jashari A, Imeri F, Ibrahim I, Mikhova B, *et al.* Potential antiproliferative effect of isoxazolo-and thiazolo coumarin derivatives on breast cancer mediated bone and lung metastases. **Acta Pharmaceut** 2015; 65:53-63.
- [52] Wang Y, Li CF, Pan LM, Gao ZL. 7, 8-Dihydroxycoumarin inhibits A549 human lung adenocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis *via* suppression of Akt/NF- κ B signaling. **Exp Ther Med** 2013; 5:1770-74.
- [53] Xu X, Zhang Y, Qu D, Jiang T, Li S. Osthole induces G2/M-arrest and apoptosis in lung cancer A549 cells by modulating PI3K/Akt pathway. **J Exp Clin Cancer Res** 2011; 30:33-39.
- [54] Lu Y, Wang Y, Zhu W. Nonbonding interactions of organic halogens in biological systems: implications for drug discovery and biomolecular design. **Phys Chem Chem Phys** 2010;12:4543-51.
- [55] Arnold S, Goglia F, Kadenbach B. 3, 5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. **Eur J Biochem** 1998; 252:325-30.
- [56] Wilcken R, Liu X, Zimmermann MO, Rutherford TJ, Fersht AR, Joerger AC, *et al.* Halogen-enriched fragment libraries as leads for drug rescue of mutant p53. **J Am Chem Soc** 2012; 134:6810-18.
- [57] Basanagouda M, Jambagi VB, Barigidad NN, Laxmeshwar SS, Devaru V. Synthesis, structure–activity relationship of iodinated-4-aryloxymethyl-coumarins as potential anti-cancer and anti-mycobacterial agents. **Eur J Med Chem** 2014; 74:225-33.
- [58] Wang Q, Guo Y, Jiang S, Dong M, Kuerban K, Li J, *et al.* A hybrid of coumarin and phenylsulfonylfuroxan induces caspase-dependent apoptosis and cytoprotective autophagy in lung adenocarcinoma cells. **Phytomedicine** 2018; 39:160-67.
- [59] Kasaian J, Mosaffa F, Behravan J, Masullo M, Piacente S, Ghandadi M, *et al.* Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in MCF-7/Adr cancer cells by sesquiterpene coumarins. **Fitoterapia** 2015; 103:149-54



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان
دانشکده داروسازی

پایان نامه خانم آزاده ابراهیمی دانشجوی داروسازی ورودی ۹۳ به شماره ۱۲۰۴

تحت عنوان:

بررسی سمیت سلولی تعدادی از مشتقات کوپارینی ستر شده بر روی رده سلولی 3T3 و MCF-7

استاد (اساتید) راهنما:

دکتر صالحه صیوری

دکتر مهدی عباس زاده

هیئت محترم داوران:

۱- دکتر عبدالرضا حسن زاده ۲- دکتر مجتبی شکیبایی ۳- دکتر حمید فروتن فر

در تاریخ ۹۹/۰۶/۳۰ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۹/۲۵
(با حروف) نوزده و دو به تصویب رسید.

دکتر مصطفی پورنامداری
رئیس اداره پایان نامه

محمد رضا نخعی
کارشناس اداره پایان نامه

دکتر باقر امیرحیدری
رئیس دانشکده

دکتر میترا مهربانی
معاون پژوهشی دانشکده